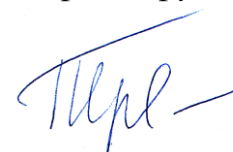


На правах рукописи



Трусей Ирина Валерьевна

**СТИМУЛЯЦИЯ IN SITU АВТОХТОННЫХ ПСИХРОФИЛЬНЫХ И
МЕЗОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ
ГРУНТОВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ**

03.02.08 экология
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2018

Работа выполнена в ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук", ФГБОУ ВО «Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева», г. Красноярск.

Научный руководитель: **Гуревич Юрий Леонидович**
доктор физико-математических наук
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»,
г. Красноярск

Официальные оппоненты: **Маркова Юлия Александровна**
доктор биологических наук, заведующая лабораторией растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН», г. Иркутск

Сваровская Лидия Ивановна
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории коллоидной химии нефти Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химии нефти Сибирского отделения Российской академии наук», г. Томск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Сыктывкар

Защита диссертации состоится «20» декабря 2018 г. в 16⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М. М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «ИГУ» им. В. Г. Распутина по адресу: 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124, и на сайте Иркутского государственного университета: <https://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=148>

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет ИГУ. Тел./факс: (3952)24-18-55, e-mail:dissovet07@gmail.com

Автореферат разослан « __ » октября 2018 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



А. А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Углеводороды нефти относятся к широко распространенным поллютантам поверхностных и подземных экосистем (Vogt and Richnow, 2014). При добыче, транспортировке, переработке и хранении в результате аварийных разливов ежегодно теряется 2% от извлекаемой из недр нефти, это составляет 60–70 млн. тонн в год (Филонов, 2016). Помимо загрязнения сырой нефтью, регистрируется загрязнение продуктами ее переработки. По оценкам специалистов при однократном загрязнении, углеводороды в грунтах могут оставаться в неизменном виде сотни и даже тысячи лет (Другов и Родин, 2007). Для ликвидации последствий углеводородного загрязнения используют два метода биоремедиации – *биостимуляцию* (активизация роста автохтонной микрофлоры) и *биоаугментацию* (интродукция композиций из смешанных культур углеводородокисляющих микроорганизмов) (Atlas, 1995; Климентова и др., 2007; Филонов, 2016).

Биостимуляция включает в себя модификацию среды для активизации автохтонных бактерий, способных к биоремедиации, и осуществляется путем коррекции таких условий, как аэрируемость, содержание биогенных элементов питания, pH и температура (Margesin et al., 2000). Основным преимуществом биостимуляции является то, что автохтонные микроорганизмы адаптированы к условиям среды и занимают все пространство загрязненной зоны. На практике, биостимуляцию чаще всего осуществляют путем внесения минеральных биогенных элементов питания в загрязненную зону.

В сравнении с биостимуляцией, методы биоаугментации часто представляются как необходимый и эффективный подход. В связи с этим отметим, что при мероприятиях биоаугментации вместе с культурами микроорганизмов в обрабатываемую систему обязательно вносят биогенные элементы. Ряд авторов считают, что вклад интродуцированных микроорганизмов в деградацию поллютанта существенно меньше, чем вклад биогенных элементов (Atlas, 1995; *Psycrophiles: from Biodiversity...*, 2008). Следует также отметить, что биостимуляция относительно просто реализуемая технология и возможности ее изучены недостаточно полно. В настоящем, мало работ, посвященных исследованию биостимуляции нефтезагрязненных объектов в условиях *in situ* (Sorvari et al., 2009; Simpanen et al., 2016). Особенно это касается грунтов, загрязненных углеводородами, где применение ряда биоремедиационных мероприятий, эффективных в поверхностных экосистемах, сильно ограничено. Подавляющее большинство исследований по биоремедиации подземных экосистем выполнено за рубежом (Williams et al., 1997; Werner et al., 1997; Thurmann et al., 1999; Ivshina et al., 2015). При этом предлагаемые технологии биоремедиации грунтов, такие как *bioventing* и *air-sparging*, весьма трудоемки и затратны (Werner et al., 1997; *In-situ Air Sparging*, 2013).

Для эффективной стимуляции автохтонной микрофлоры экосистемы, нарушенной в результате углеводородного загрязнения, необходимо учитывать и другие факторы, лимитирующие развитие микроорганизмов. В частности, один из важных факторов, ограничивающий биodeградационный потенциал нефтезагрязненных почв и грунтов – низкая температура среды. В связи с чем, наряду с изучением мезофильных автохтонных микроорганизмов, большое значение имеет исследование психро-

фильных, которые способны деградировать загрязнение в условиях низких температур.

Цель настоящего исследования – оценка эффекта стимуляции автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов при биоремедиации грунтов зоны аэрации и грунтовых вод, загрязненных нефтепродуктами.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие **задачи**.

1. Определить характеристики роста изолятов психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов нефтезагрязненной почвы Средней Сибири, при культивировании на среде с углеводородами.
2. Провести сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов в верхнем горизонте почвы и грунтах, загрязненных углеводородами.
3. Изучить влияние условий среды на численность автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов в нефтезагрязненной почве в лабораторных и натуральных экспериментах.
4. Оценить эффект стимуляции автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов при внесении биогенных элементов питания для биоремедиации грунтов, загрязненных нефтепродуктами.

Научная новизна работы. Впервые проведен сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов, участвующих в биоремедиации верхнего горизонта почвы и грунтов, загрязненных углеводородами в условиях Средней Сибири. Показано, что в поверхностном горизонте почвы численность психрофильных микроорганизмов ниже, чем мезофильных соответствующих эколого-трофических групп. В грунтах на глубинах 1-5 м численность психрофильных микроорганизмов сопоставима с численностью мезофильных, на глубинах 15 м, численность психрофильных на порядок выше. Показано, что внесение карбамидоформальдегидного полимера, обладающего свойствами структурообразователя почвы и пролонгированного азотного удобрения, увеличивает численность автохтонных микроорганизмов на 2-4 порядка. Апробирован способ стимуляции автохтонных микроорганизмов геологической среды (грунты зон аэрации, насыщения и грунтовые воды), загрязненной нефтепродуктами, посредством внесения биогенных элементов питания через верхний горизонт грунта и систему наблюдательных скважин. Показано, что биостимуляция микроорганизмов сопровождается увеличением в грунтовых водах содержания аммонийного и нитратного азота, углекислого газа и перманганатной окисляемости, являющихся индикаторами протекающих процессов восстановления.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы позволили расширить знания о распространении психрофильных микроорганизмов в почвах и грунтах в условиях Средней Сибири. Механизм стимуляции развития автохтонной микрофлоры посредством внесения карбамидоформальдегидного полимера в качестве удобрения пролонгированного действия и структурообразователя в нефтезагрязненную почву может применяться для биоремедиации углеводородзагрязненных почв.

Разработана схема мероприятий по биостимуляции грунтов и грунтовых вод, загрязненных нефтепродуктами путем внесения минеральных биогенных элементов

питания через верхний горизонт грунта и систему наблюдательных скважин. Подбор биогенных элементов проводился с учетом особенностей ключевых групп микроорганизмов, включая анаэробные, а также изменения гидрохимических показателей в грунтовых водах. Схема мероприятий по биостимуляции грунтов прошла апробацию и используется для восстановления геологической среды, загрязненной нефтепродуктами на Абаканской ТЭЦ.

Защищаемые положения:

1. На территории Средней Сибири в грунтах, загрязненных нефтепродуктами, присутствует автохтонное психрофильное сообщество аэробных и анаэробных микроорганизмов, стимуляция которого может играть одну из доминирующих ролей в восстановлении грунтов и грунтовых вод.

2. Стимуляция автохтонного сообщества микроорганизмов минеральными биогенными элементами питания, учитывающая особенности ключевых эколого-трофических групп микроорганизмов и динамику гидрохимических показателей загрязненных нефтепродуктами грунтовых вод, обеспечивает ускорение их восстановления, которое может сопровождаться временным увеличением концентраций аммония и перманганатной окисляемости.

Личный вклад автора. Лабораторные и натурные эксперименты с нефтезагрязненной почвой, планирование и проведение работ по биостимуляции в грунтах, обработка и интерпретация полученных результатов выполнены автором. Сбор данных по численности микроорганизмов разных эколого-трофических групп в грунтах проводился совместно с к.ф.-м.н В. П. Ладыгиной. Интерпретация гидродинамических показателей пород грунта с нефтехранилища на территории г. Красноярска проведена совместно с к.г.-м.н. А.Ю. Озерским (Геозэкологическая партия ОАО «Красноярскгэология»). Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Апробация работы. Материалы исследований были представлены на конференциях: VI Международной научной школе-конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (Абакан, 2002); VII Международной научной школе-конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (Абакан, 2003); Научно-практической конференции «Теоретические и практические вопросы мониторинга, предупреждения, ликвидации и рекультивации последствий нефтяного загрязнения» (Тюмень, 2003); Конференции молодых ученых КНЦ СО РАН (Красноярск, 2003); Всероссийской научно-технической конференции «Социальные проблемы инженерной экологии, природопользования и ресурсосбережения» (Красноярск, 2003); X Всероссийской научной конференции студентов-физиков (Екатеринбург – Москва, 2004); IV Съезде Докучаевского общества почвоведов (Новосибирск, 2004); The 2-nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (Shanghai, 2008); Международной научно-практической конференции «Advanced Science» (Пенза, 2017).

Публикации. По материалам диссертации автором опубликовано 13 работ, из них 2 работы отражены в международной базе данных SCOPUS, 4 работы опубликовано в журналах ВАК РФ.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 178 страницах текста, содержит 52 рисунка, 18 таблиц и 7 приложений. Работа состоит из введе-

ния, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего ссылки на 189 источников, из которых 60 – на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность д.ф.-м.н. Ю. Л. Гуревичу за методическое руководство, к.ф.-м.н. В. П. Ладыгиной за помощь в получении данных, д.б.н. С. В. Хижняку за помощь в обработке данных, к.г.-м.н. А. Ю. Озерскому, к.т.н. Ю. П. Ланкину за помощь в проведении нейросетевого анализа, д.б.н. Е. Я. Мучкиной, М. И. Теремовой за практическую помощь и ценные советы.

Работа частично выполнена при поддержке: Красноярского краевого фонда науки (грант М0041 от 2000 г.).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Представлен обзор литературы по особенностям биоремедиации нефтеноарушенных экосистем в условиях холодного климата. Рассмотрены факторы лимитирующие процесс самоочищения экосистем, а также подходы позволяющие ускорить этот процесс. Рассмотрены биохимические особенности психрофильных микроорганизмов, деградирующих углеводороды и их отличия от мезофильных. Также рассмотрены особенности биологической деградации углеводородного загрязнения и трудности проведения биоремедиационных мероприятий в грунтах, являющихся естественной эконишей для психрофильных микроорганизмов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – микробные сообщества почвы и грунтов Средней Сибири, загрязненных углеводородами. Изучали изменение численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов основных эколого-трофических групп, при проведении стимулирующих мероприятий с целью биоремедиации почв и геологической среды (грунты зоны аэрации и грунтовые воды), загрязненных углеводородами. Под микроорганизмами в настоящем исследовании понимают бактерии, так как они представляли подавляющее большинство во всех посевах, также регистрировались дрожжи.

По отношению к температуре исследовали нижеперечисленные температурные группы (Жизнь растений Т. 1, 1974; Экология микроорганизмов, 2004). Мезофильные – микроорганизмы, растущие в диапазоне температур 15 – 40°C, с температурным оптимумом 30 – 37°C. Психрофильные (cold-adapted) холодолюбивые микроорганизмы: облигатные психрофилы – микроорганизмы растущие при температурах ниже 20°C (оптимум ниже 15°C), вплоть до отрицательных значений; факультативные психрофилы (психротрофные) – микроорганизмы, растущие в диапазоне 0 – 35°C с температурным оптимумом 25 – 30 °C. Исследовали следующие эколого-трофические (физиологические) группы микроорганизмов: углеводородокисляющие, аммонифицирующие, денитрифицирующие, сульфатредуцирующие, железоредуцирующие.

В Красноярском крае исследовали загрязненные углеводородами верхний горизонт серой почвы (10-15 см) и грунты зон аэрации и насыщения (выше и ниже уровня грунтовых вод) под хранилищем нефтепродуктов. Почва была загрязнена в

результате аварийного разлива сырой нефти при разрыве нефтепровода. Загрязнение грунта произошло в результате утечек нефтепродуктов из хранилища. В Хакасии исследовали загрязненные нефтепродуктами грунты зоны аэрации и грунтовые воды, залегающие под территорией мазутного хозяйства Абаканской ТЭЦ. Для анализа грунтовых вод отбирали пробы из наблюдательных скважин (номера скважин 159, 160, 161, 237, 238, 239, 588 и 589), расположенных в областях с разным уровнем загрязнения. Для исследования грунтов в районе с максимальным загрязнением (вблизи скважины 159) отбирались пробы грунта из инженерно-геологических скважин.

Для исследования автохтонной микрофлоры нефтезагрязненной почвы и оценки возможности ее стимуляции, посредством коррекции условий среды, проводили лабораторные и натурные эксперименты. В данных экспериментах в качестве стимулирующего реагента использовали карбамидоформальдегидный полимер, являющийся удобрением пролонгированного действия и сруктурообразователем почвы (Меньшикова, 2017), а также азотно-фосфорные удобрения.

Опытная работа по стимуляции автохтонной микрофлоры грунтов проводилась на территории ТЭЦ. Апробировали методику стимуляции автохтонной микрофлоры посредством внесения биогенных элементов питания (в виде минеральных солей входящих в состав удобрений) в грунты зон аэрации и насыщения через верхний горизонт и систему наблюдательных скважин (табл. 1). Данные по химическому составу грунтовых вод предоставлены сотрудниками ООО «Минусинская гидрогеологическая партия».

Таблица 1 – Бистимулирующие мероприятия в грунтах зон аэрации и насыщения территории мазутного хозяйства Абаканской ТЭЦ

Время внесения удобрения	Вид обработки	Удобрения	№ скважины			
			159	237	238	239
18.07.2005 – 25.08.2005	Внесение на поверхностный горизонт грунта	аммофос ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), кг сульфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), кг	4,0 4,0	-	-	-
	Налив в скважины	нитроаммофос ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{NO}_3$), кг сульфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), кг сульфат магния (MgSO_4), кг	15,5 11,0 0,9	3,0 2,0 -	0,12 - -	0,12 - -
02.09.2005 – 20.09.2005	Налив в скважины	нитроаммофос ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{NO}_3$), кг	6,0	-	-	-
		сульфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), кг сульфат магния (MgSO_4), кг	4,5 0,9	-	-	-
31.08.2006; 11.09.2006 – 17.09.2006	Внесение на поверхностный горизонт грунта	нитроаммофос ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{NO}_3$), кг аммофос ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), кг	2,5 1,0	-	-	-
	Налив в скважины	нитроаммофос ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{NO}_3$), кг аммофос ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), кг	3,75 1,5	-	3,75 1,5	-

ГЛАВА 3. ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛЕННОСТИ АВТОХТОННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ ПОЧВЕ ПРИ КОРРЕКЦИИ УСЛОВИЙ СРЕДЫ

Из исследуемого верхнего горизонта почвы Средней Сибири, загрязненного сырой нефтью, были выделены (при температуре +10 °С) 22 изолята психрофильных углеводородоокисляющих микроорганизмов (95,5% бактерии, 4,5% дрожжевые грибы), которые культивировали при температурах +5, +15, +21, +27 и +35 °С на пептонном агаре (ПА) и минерально-солевой среде (МСС) с нефтью. При культивировании изолятов на ПА, отмечалось изменение температурных оптимумов и диапазонов роста по сравнению с аналогичными показателями на МСС с нефтью (табл. 2). При культивировании на ПА, 63% изолятов имеют температурный оптимум близкий к +21 °С и 25% – близкий к 27 °С. При культивировании этих же изолятов микроорганизмов на среде с нефтью температурный оптимум смещается в более высокую область, у 50% изолятов температурный оптимум близок к +27 °С. Также при культивировании на среде с нефтью, отмечалось сужение температурного диапазона роста, 66% изолятов микроорганизмов не образовывали колонии при температуре +5 °С, а 50% – при +35 °С.

Таблица 2 – Характеристика изолятов почвенных углеводородоокисляющих микроорганизмов при культивировании на разных средах

Среда	Доля изолятов не растущих при +5 °С	Доля изолятов не растущих при +35 °С	Доля изолятов имеющих оптимальную Т близкую к +21 °С	Доля изолятов имеющих оптимальную Т близкую к +27 °С
Пептонный агар	12,5%	25%	63%	25%
Минерально-солевая среда с нефтью	66,7%	50%	16%	50%

В результате проведенных исследований установлено что, температурные характеристики микроорганизмов зависят от среды культивирования. Однофакторный дисперсионный анализ показал, что показатель силы влияния температуры на рост изолятов при выращивании на пептонном агаре составляет 38,2% (уровень значимости $P < 0,05$; $F_{\phi} = 5,40$, $F_{\text{табл.}} = 2,64$), в то время как при культивировании на МСС с нефтью – 84,7% (уровень значимости $P < 0,05$; $F_{\phi} = 46,98$, $F_{\text{табл.}} = 2,64$). Двухфакторный дисперсионный анализ показал статистически значимый ($P < 0,05$) эффект взаимодействия факторов «температура» и «среда» на рост микроорганизмов. Показатель силы влияния для взаимодействия составляет 15,2%. Таким образом, на среде с нефтью микроорганизмы более «чувствительны» к температуре, чем на богатой органической среде. Вероятнее всего это связано с доступностью углеводов нефти. При снижении температуры вязкость и плотность нефти увеличиваются, в результате клетка не способна использовать ее в качестве питательного субстрата (Margesin, 2000; Белякова и Таушева, 2004).

Сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов в микроекосмах с нефтезагрязненной почвой, показал, что с доверительной вероятностью 0,97 (критерий Вилкоксона) в «теплом» микроекосме (культивируемом, при температуре +35 °С) численность мезофильных аммонификаторов (средняя

численность – $(1,38 \pm 0,85) \cdot 10^7$ КОЕ/г) выше психрофильных (средняя численность – $(0,61 \pm 0,13) \cdot 10^7$ КОЕ/г). В «холодном» микрокосме (культивируемом, при температуре $+5^\circ\text{C}$) численность психрофильных микроорганизмов держалась на одном уровне с мезофильными и составляла 10^6 – 10^7 КОЕ/г, достоверных отличий между ними обнаружено не было ($P > 0,05$). Длительное культивирование при низких температурах приводит к увеличению численности психрофильных аммонифицирующих и углеводородокисляющих микроорганизмов в 2-5 раза с достоверностью $P=0,97$ и $0,94$ соответственно. В целом анализ роста микроорганизмов на ПА показал, что 93,7% исследуемых психрофильных изолятов, можно отнести к факультативным психрофилам, а 6,3% – облигатным.

Выделенные микроорганизмы были способны расти на минерально-солевой среде с нефтепродуктами – дизельным топливом и маслами (M10Г2), индивидуальными субстратами – октаном и бензолом при температуре $+10^\circ\text{C}$.

В лабораторных условиях показано, что при коррекции условий среды посредством внесения карбамидоформальдегидного полимера в почву микрокосмов, отмечается увеличение численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов. Численность микроорганизмов в микрокосме с полимером (средняя численность – $0,91 \cdot 10^7$ КОЕ/г) приближалась к численности в аэрируемом микрокосме (рыхлили стерильным шпателем) ($1,15 \cdot 10^7$ КОЕ/г) и была выше, чем в контроле ($0,55 \cdot 10^7$ КОЕ/г) (достоверность 0,99). Т.е. однократное внесение карбамидоформальдегидного полимера позволяет заменить 4-5 рыхлений, поддерживает более благоприятный воздушный режим. При изменении температуры почвы, полимер с достоверной вероятностью 0,98 поддерживает численность микроорганизмов на более высоком уровне (рис. 1, 2).

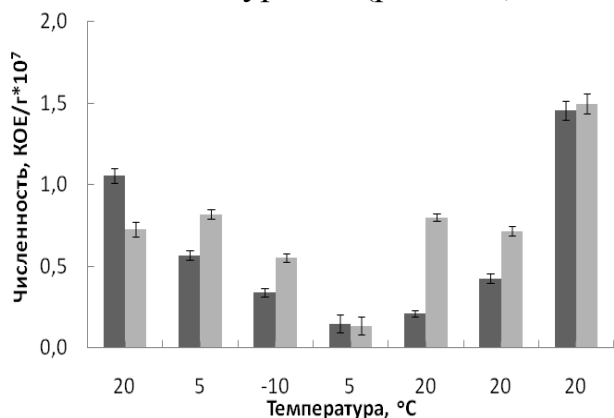


Рисунок 1 – Численность мезофильных аммонифицирующих бактерий в почвенных микрокосмах: 1 – контроль, 2 – карбамидоформальдегидный полимер.

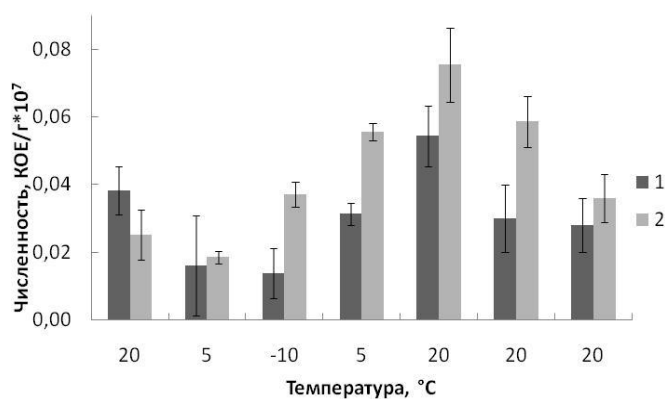


Рисунок 2 – Численность психрофильных аммонифицирующих бактерий в почвенных микрокосмах: 1 – контроль, 2 – карбамидоформальдегидный полимер.

В полевых условиях анализировали изменение численности микроорганизмов нефтезагрязненной почвы при внесении карбамидоформальдегидного полимера, мела, ассоциаций микроорганизмов на фоне внесения биогенных элементов. В течение всего эксперимента концентрация нефти на опытных площадках варьировала в диапазоне от 97 г/кг до 167 г/кг. На обработанных площадках численность микроорганизмов была выше на 2-3 порядка, чем контрольной. Средняя численность мезофильных углеводородокисляющих микроорганизмов на обработанных площадках

увеличилась с $2,8 \cdot 10^5$ до $1,95 \cdot 10^8$ КОЕ/г (рис. 3), а психрофильных – с $2,0 \cdot 10^5$ до $1,9 \cdot 10^7$ КОЕ/г (рис. 4).

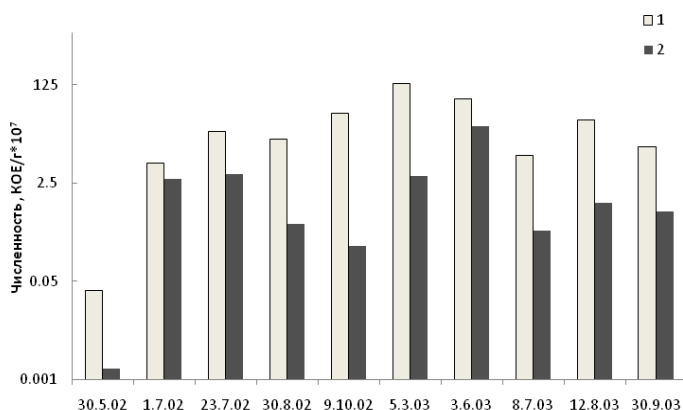


Рисунок 3 – Динамика численности мезофильных углеводородоокисляющих микроорганизмов: 1 – среднее по обработанным площадкам; 2 – контрольная.

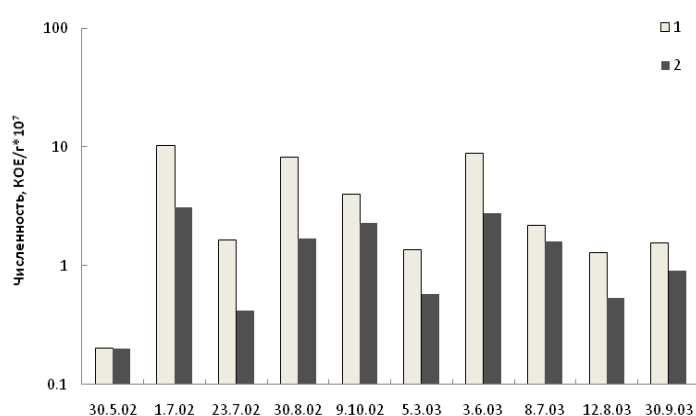


Рисунок 4 – Динамика численности психрофильных углеводородоокисляющих микроорганизмов: 1 – среднее по обработанным площадкам; 2 – контрольная.

При этом анализ показал, что наибольшее положительное влияние на развитие почвенных микроорганизмов оказал карбамидоформальдегидный полимер. Динамика численности на площадках с полимером и без представлена на рисунках 5 и 6. Внесение мела с доверительной вероятностью 0,95 или 0,90 оказывало отрицательное влияние на численность мезофильных и психрофильных микроорганизмов. Использование ассоциации №2 с вероятностью 0,98 (критерий Вилкоксона) повлияло только на численность психрофильных аммонификаторов. На численность других групп микроорганизмов эта процедура не оказала значимое влияние.

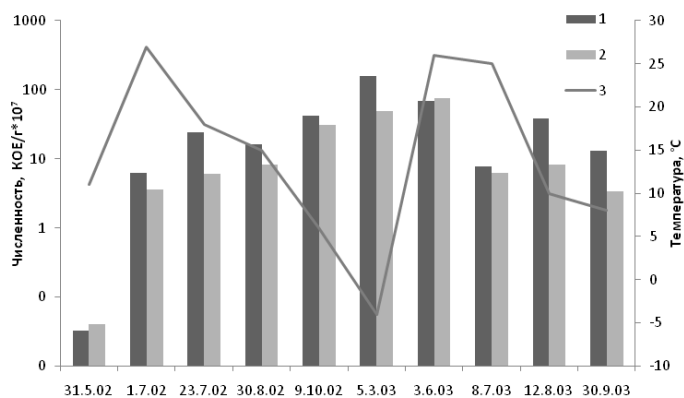


Рисунок 5 – Влияние карбамидоформальдегидного полимера на численность углеводородоокисляющих мезофильных бактерий: 1 – среднее по площадкам с полимером; 2 – площадка без полимера; 3 – температура почвы на глубине 5 см.

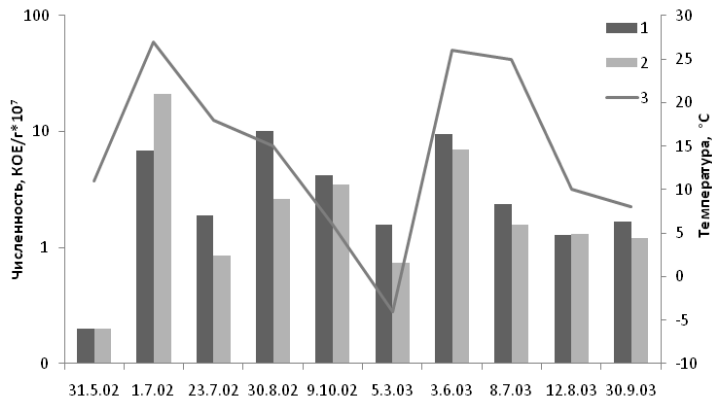


Рисунок 6 – Влияние карбамидоформальдегидного полимера на численность психрофильных бактерий: 1 – среднее по площадкам с полимером; 2 – площадка без полимера; 3 – температура почвы на глубине 5 см.

Таким образом, психрофильная микрофлора играет одну из ключевых ролей в биоремедиации нефтезагрязненных почв в условиях Средней Сибири. Коррекция условий среды с помощью биогенных элементов и карбамидоформальдегидного полимера в качестве структурообразователя и удобрения пролонгированного действия, позволяет увеличить численность автохтонных микроорганизмов на 2-4 порядка. При этом, эффект от обработки сохранялся и через год, численность углеводоро-

доксиляющих микроорганизмов была 10^8 КОЕ/г, а аммонифицирующих – 10^9 КОЕ/г.

ГЛАВА 4. СТИМУЛЯЦИЯ АВТОХТОННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ IN SITU В ГРУНТАХ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

4.1 Факторы, определяющие распределение микроорганизмов в грунтах

Исследуемые грунты имеют температуру $+4 - +8$ °С и являются естественной эконишей для психрофильных микроорганизмов. Анализ грунтов хранилища нефтепродуктов на территории г. Красноярска показал, что численность психрофильных, в отличие от почвенных экосистем этой же зоны, сравнима с численностью мезофильных, а в нижнем горизонте на порядок выше (рис. 7). Показано, что на их распределение в грунтах влияют гидрогеологические свойства породы: пористость, проницаемость грунта, коэффициент фильтрации.

Анализировали породы находящиеся в зоне аэрации (суглинки) и породы зоны насыщения (гравелит и алевролит). Суглинки характеризуются низкой численностью всех групп микроорганизмов, что связано с отсутствием гравитационных вод. Численность мезофильных аммонификаторов составляла $(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^5$ КОЕ/г, психрофильных – $(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^6$ КОЕ/г. Численность углеводородоксиляющих была на порядок ниже, мезофильных – $(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^4$ КОЕ/г, психрофильных – $(3,3 \pm 0,3) \cdot 10^5$ КОЕ/г (рис. 7). Наиболее высокая численность микроорганизмов наблюдалась в алевролитах на глубине 13.0-15.0 м. В отличие от гравелитов, которые также находятся в зоне насыщения, алевролиты обладают минимальной проницаемостью (коэффициент фильтрации – 0,00023 м/сут). Поэтому в гравелитах, имеющих больший коэффициент фильтрации (0,0033 м/сут) происходит вынос клеток микроорганизмов фильтрационным потоком.

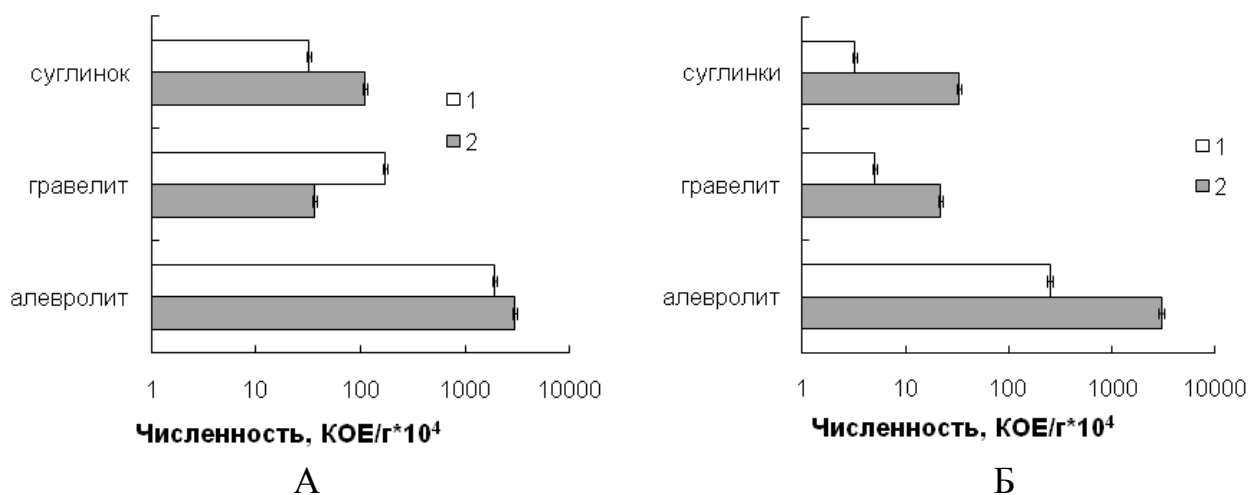


Рисунок 7 – Распределение аммонифицирующих (А) и углеводородоксиляющих (Б) микроорганизмов в грунтах хранилища нефтепродуктов на территории г. Красноярска: 1 – мезофильные, 2 – психрофильные.

Также в грунтах анализировали распределение анаэробных микроорганизмов – железоредуцирующих и денитрифицирующих. Денитрификаторы были обнаружены только в алевролитах, их численность составляет $(8,3 \pm 0,9) \cdot 10^5$ КОЕ/г грунта. Железоредуцирующие распространены повсеместно, в нижнем горизонте их численность сопоставима с аммонифицирующими и составляет $(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^7$ КОЕ/г.

4.2 Стимуляция автохтонных микроорганизмов в грунтах зоны аэрации

При биостимуляции в грунтах зоны аэрации на территории мазутного хозяйства ТЭЦ (табл. 2.) отмечалось увеличение численности аэробных микроорганизмов. Численность мезофильных и психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов изменилась с 10^5 КОЕ/г до 10^6 КОЕ/г (рис. 8). Помимо того, что в целом увеличилась численность микроорганизмов, изменилось их соотношение. На начальном этапе доля углеводородокисляющих психрофилов, от общего числа углеводородокисляющих на поверхности составляла 20%, с глубиной увеличивалась до 38%. После внесения биогенов доля психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов увеличилась во всех образцах до 40 – 53%.

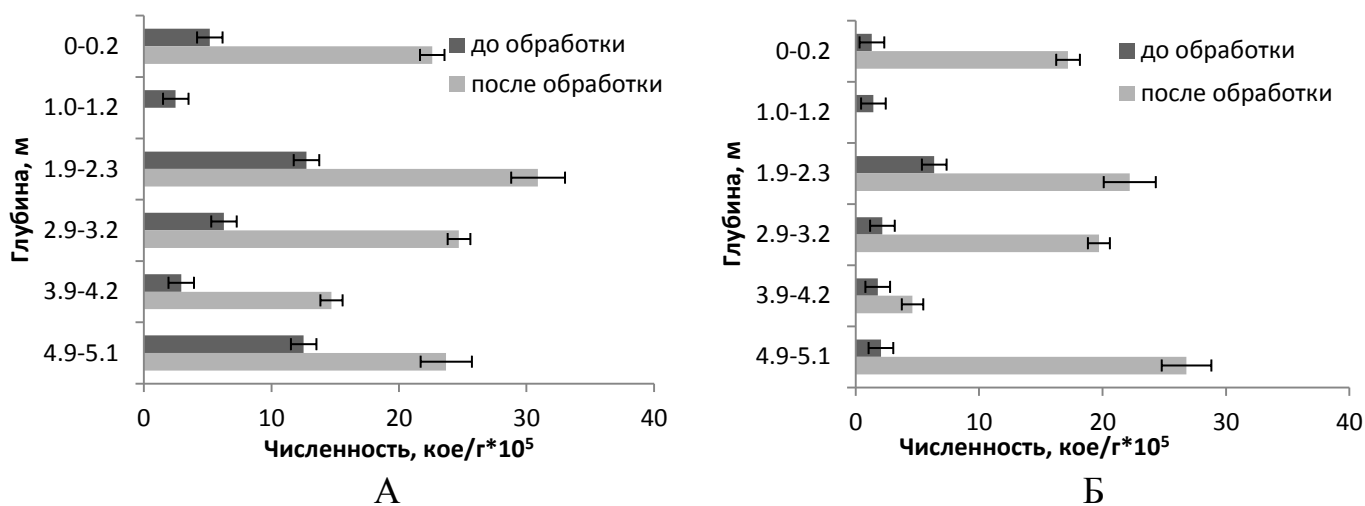


Рисунок 8 – Влияние биоремедиационной обработки на распределение мезофильных (А) и психрофильных (Б) углеводородокисляющих микроорганизмов в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ.

В грунтах до обработки биогенными элементами, численность мезофильных аммонификаторов в верхнем горизонте составляла $(7,27 \pm 0,4) \cdot 10^6$ КОЕ/г, с глубиной наблюдалось незначительное снижение до $(1,81 \pm 0,06) \cdot 10^6$ КОЕ/г. После внесения биогенных элементов, численность мезофильных аммонификаторов также увеличилась на порядок, и в верхнем горизонте составляла $(3,83 \pm 1,85) \cdot 10^7$ КОЕ/г. Численность психрофильных аммонификаторов на начало исследования колебалась в пределах $10^5 - 10^6$ КОЕ/г, после – $10^6 - 10^7$ КОЕ/г. После внесения биогенных элементов численность психрофильных микроорганизмов стала сопоставимой с мезофильными.

Также анализировали численность анаэробных микроорганизмов. Численность мезофильных денитрификаторов в грунте составляла порядка $10^3 - 10^4$ КОЕ/г и с глубиной снижалась, напротив численность психрофильных с глубиной увеличивалась и составляла $10^4 - 10^5$ КОЕ/г. После обработки биогенными элементами численность денитрификаторов по всей толще грунта снизилась на 2-4 порядка. Мезофильные денитрификаторы встречались во всех образцах, их численность составляла 10^2 КОЕ/г, только в зоне насыщения имела тот же порядок численности, что и до – $1,15 \cdot 10^4$ КОЕ/г. Численность психрофильных денитрификаторов снизилась до $10 - 10^2$ КОЕ/г, в некоторых образцах они вообще не фиксировались. Численность железоредуцирующих бактерий также снизилась (рис. 9). На начальном этапе на всех ис-

следуемых глубинах фиксировались обе температурные группы микроорганизмов, при этом доля психрофильных форм с глубиной увеличивалась. Численность мезофильных и психрофильных железоредуцирующих составляла порядка 10^2 КОЕ/г (рис. 9, А). После внесения биогенов произошло увеличение численности мезофильных железоредукторов только в приповерхностном слое, в нижних горизонтах их численность снизилась на порядок, а психрофильные вообще не фиксировались (рис. 9, Б).

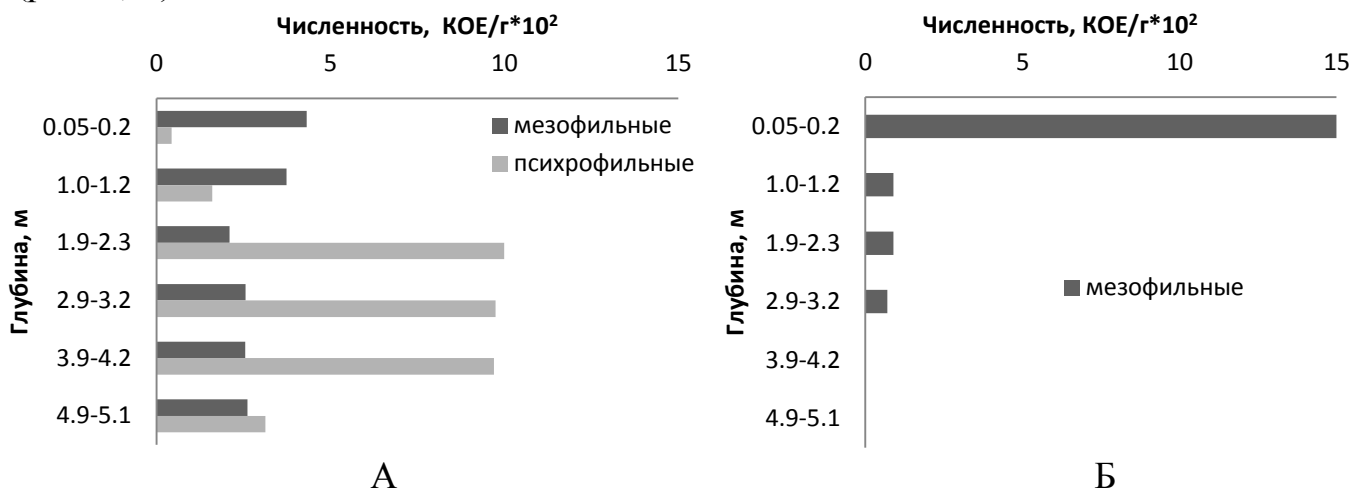


Рисунок 9 – Численность железоредуцирующих микроорганизмов в грунтах мазутного хозяйства ТЭЦ до внесения биогенных элементов (А) и после (Б).

Внесение минеральных элементов также повлияло на численность сульфатредуцирующих микроорганизмов. Их численность немного снизилась, но порядок остался таким же – 10^2 КОЕ/г. При этом на начальном этапе численность мезофильных сульфатредукторов была выше или сопоставима с численностью психрофильных, после внесения удобрений численность психрофильных стала выше.

Таким образом, обработка биогенными элементами оказывала положительное воздействие на численность аэробных микроорганизмов, при этом увеличивалась доля психрофильных микроорганизмов. Однако внесение биогенов приводила к снижению в грунтах зоны аэрации численности анаэробных микроорганизмов всех исследуемых групп, особенно «чувствительны» оказались психрофильные денитрификаторы и железоредукторы.

4.3 Стимуляция автохтонных микроорганизмов в грунтовых водах

В результате биостимуляции, численность аэробных микроорганизмов в грунтовых водах увеличилась на 2-4 порядка. Наиболее значительные изменения наблюдались в скважине 159 (расположена в зоне максимального загрязнения нефтепродуктами), где была проведена наиболее интенсивная обработка (табл. 1). Численность мезофильных аммонификаторов увеличилась с $(1,45 \pm 0,05) \cdot 10^5$ КОЕ/мл до $(1,79 \pm 1,04) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Изменение численности углеводородокисляющих мезофилов имело тот же характер, она увеличилась с $(1,26 \pm 0,21) \cdot 10^5$ КОЕ/мл до $(2,31 \pm 1,14) \cdot 10^7$ КОЕ/мл (рис. 10). Последующее внесение биогенных элементов уже не стимулировало развитие мезофильных микроорганизмов, численность аммонифицирующих снизилась до $(2,08 \pm 1,33) \cdot 10^7$ КОЕ/мл, а углеводородокисляющих до $(1,41 \pm 0,9) \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Характер динамики численности психрофильных аммони-

фикаторов и углеводородокисляющих отличается от мезофильных микроорганизмов. После первого этапа обработки численность психрофильных аммонификаторов увеличилась с $(0,74 \pm 0,05) \cdot 10^5$ КОЕ/мл до $(8,86 \pm 4,43) \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Повторное внесение биогенных элементов продолжало стимулировать микроорганизмов, в результате их численность достигала значений в 2 раза выше, чем численность мезофилов в пик роста – $(2,67 \pm 0,94) \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Такая же динамика наблюдалась и в отношении углеводородокисляющих психрофилов.

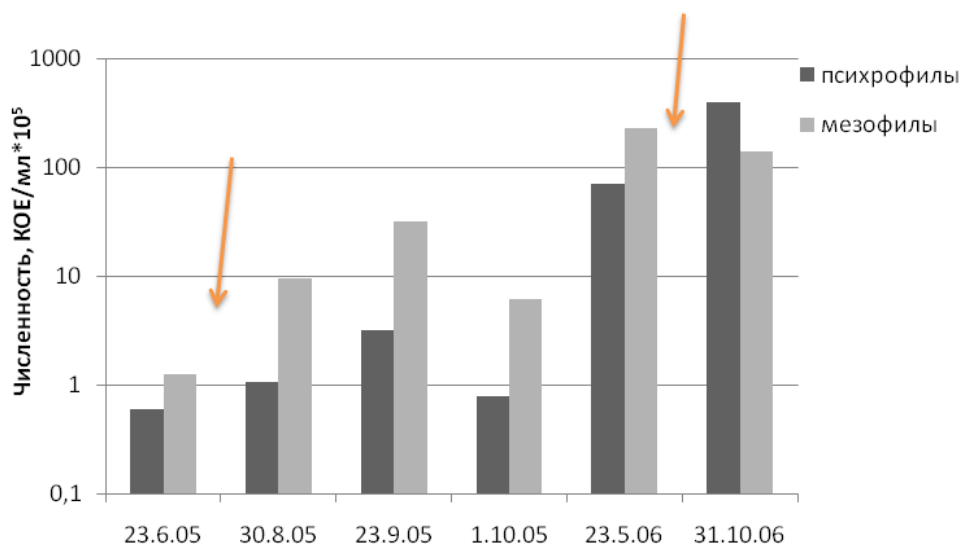


Рисунок 10 – Динамика численности мезофильных и психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов в грунтовых водах скважины 159 на территории мазутного хозяйства ТЭЦ. (стрелка – момент внесения биогенных элементов питания).

Аналогичные наблюдения относительно психрофильных наблюдались и в других скважинах (рис. 11).

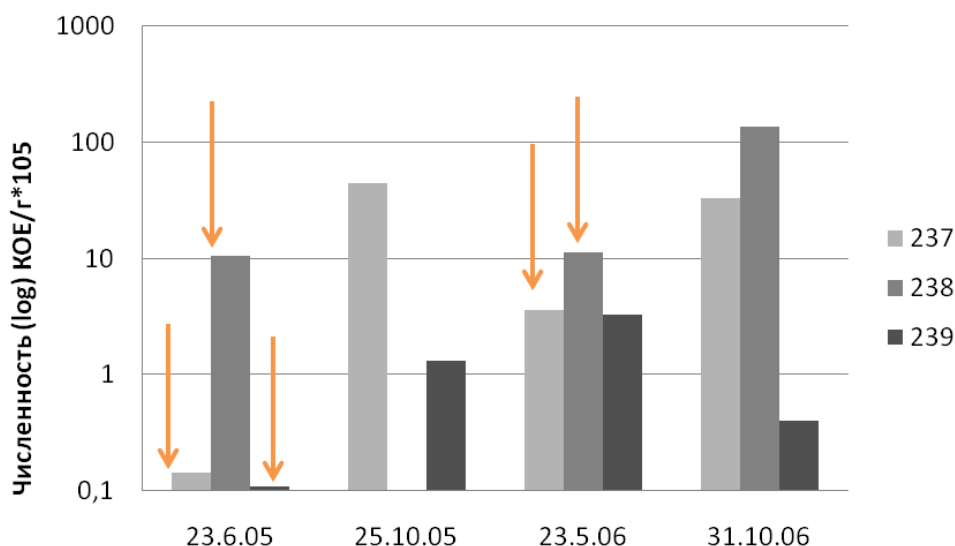


Рисунок – 11. Динамика численности психрофильных аммонификаторов в грунтовых водах наблюдательных скважин на территории мазутного хозяйства ТЭЦ. (Стрелка – момент внесения биогенных элементов питания).

При внесении минеральных элементов в грунтовые воды, наблюдалось увеличение численности денитрификаторов. В отличие от грунтов зоны аэрации, в грун-

товую воду вносили нитратную форму азота. На начальном этапе исследования, в образцах воды обнаруживались только психрофильные денитрификаторы, численность которых была в пределах от 10 – 10² КОЕ/мл (табл. 3).

Таблица 3 – Численность мезофильных и психрофильных денитрификаторов в грунтовых водах на территории мазутного хозяйства ТЭЦ (КОЕ/мл)

Температурная группа	№ скважины	Численность / Верхний и нижний пределы, КОЕ/мл•10 ³	Дата отбора образцов воды					
			2005 июнь	2005 октябрь	2006 май	2006 октябрь	2007 март	
мезофильные	159	численность	Н.о*	45,00	0,07	95,00	-	
		верхний нижний	-	9,60 210,60	0,02 0,33	20,00 445,00	-	
	237	численность	Н.о.	200,00	0,15	1,50	0,20	
		верхний нижний	-	42,70 936,00	0,03 0,70	0,32 7,02	0,04 0,94	
	589	численность	Н.о.	-	0,06	0,14	300,00	
		верхний нижний	-	-	0,01 0,28	0,03 0,66	64,00 1404,0	
	588	численность	Н.о.	-	Н.о.	0,04	7,50	
		верхний нижний	-	-	-	0,01 0,19	1,60 35,10	
	психрофильные	159	Численность	0,06	3,05	350,00	40,00	-
			верхний нижний	0,01 0,28	0,64 14,00	75,00 1638,00	8,60 187,20	-
		237	численность	0,20	2,50	0,07	2,50	0,09
			верхний нижний	0,04 0,94	0,53 11,70	0,02 0,33	0,53 11,71	0,02 0,42
589		численность	0,09	-	0,45	0,95	2,50	
		верхний нижний	0,02 0,42	-	0,10 2,11	0,20 4,45	0,53 11,70	
588		численность	Н.о.	-	0,09	0,04	0,45	
		верхний нижний	-	-	0,02 0,42	0,01 2,11	0,10 2,10	

*Примечание: Н.о. – не обнаружено, « - » – не определяли.

После внесения биогенных элементов в скважины 159 и 273 численность психрофильных денитрификаторов увеличилась на 1 – 2 порядка и составляла 10³ КОЕ/мл (табл. 3). Через 10 месяцев, после обработки, численность психрофильных денитрификаторов в грунтовой воде скважины 159 еще увеличилась на порядок и достигала 10⁵ КОЕ/мл. Таким образом, от начальной она отличалась на 3-4 порядка. Внесение минеральных элементов также стимулировало развитие мезофильных денитрификаторов, численность которых после обработки составляла 10⁴ – 10⁵ КОЕ/мл. Повторное внесение минеральных элементов снова привело к увеличению численности мезофильных и психрофильных денитрификаторов, за исключением скважины № 159, где вероятно численность денитрификаторов достигла своего максимума. Хочется отметить, что увеличение численности на 1-2 порядка также отмечалось в образцах воды скважин, в которые биогенные элементы не вносили (588 и 589). При этом в скважине, которая находится на периферии загрязненного участка

– 588 (южнее скв. 159 на 70 м) увеличение численности наблюдалось позднее, через 2 года после первоначальной обработки. Увеличение численности психрофильных денитрификаторов происходило медленнее, максимум численности психрофилов наблюдается только через год после внесения нитратов, в то время как у мезофильных через 5 месяцев. Численность психрофильных денитрификаторов, подобно психрофильным аэробам, достигала больших значений, чем мезофильных. После прекращения подпитки биогенными элементами численность мезофильных и психрофильных денитрификаторов в течение 1-2 лет вернулась к значениям $10 - 10^2$ КОЕ/мл.

4.4 Динамика гидрохимических показателей грунтовых вод при проведении стимуляции

Для оценки процессов биodeградации нефтепродуктов анализировали изменение химического состава грунтовых вод. Отмечалось увеличение концентрации углекислого газа в воде с $6,6 - 13,2$ мг/дм³ до $66 - 136,4$ мг/дм³. Также изменилась концентрация гидрокарбоната с $13,4 - 512,4$ мг/дм³ до $85,4 - 1232,2$ мг/дм³. Корреляционный анализ показал, что после внесения биогенных элементов, отмечалась сильная положительная связь между концентрацией аммония и углекислого газа (коэффициент корреляции r менялся от 0,9 до 0,95). Это может свидетельствовать о том, что в процессе окисления азотсодержащих углеводородов происходит высвобождение аммония и углекислого газа. В более поздний период после обработки (апрель 2007) отмечалась положительная связь между концентрациями аммония и гидрокарбоната (коэффициент корреляции $r=0,93$). Также, увеличилась перманганатная окисляемость грунтовой воды с $0,11 - 6$ мг O_2 /дм³, до $1,6 - 11,68$ мг O_2 /дм³. Увеличение перманганатной окисляемости свидетельствует о появлении в грунтовых водах легко окисляемых органических веществ (в основном гуминовых кислот и фульвокислот), которые образуются в результате распада углеводородов.

Анализ содержания химических форм азота в грунтовой воде в период до проведения обработки, показал, что на периферии загрязненной зоны концентрация аммония составляла $0,07$ мг/дм³, либо он не обнаруживался (скв. 237 в табл. 4). В очаге загрязнения (скв. 159, 239) концентрация аммония колебалась в пределах $1,7 - 5,1$ мг/дм³. Напротив, нитрата было больше на периферии, его концентрация изменялась в пределах $0,5 - 3,7$ мг/дм³, в очаге загрязнения – в пределах $0 - 2,5$ мг/дм³. Отмечалось периодическое увеличение концентрация нитрата на 2-3 порядка. Через 2 – 6 месяцев после внесения биогенных элементов в воде скважины 159 значительно увеличилась концентрация аммония (до $53,4$ мг/дм³). Увеличение концентрации аммония в воде связано с интенсификацией биохимических процессов и биodeградацией азотсодержащих нефтепродуктов. В высокосмолистых нефтях содержится до 10% азотистых соединений, при этом подавляющая часть концентрируется в тяжелых фракциях, которые и содержатся в нефтепродуктах (Гуреев, 1972; Яновская и Сагаченко, 2009). Соответственно, появление аммония в грунтовой воде свидетельствует об интенсификации процесса распада азотсодержащих углеводородов. Также интенсифицировался процесс нитрификации, особенно это было заметно на периферии пятна загрязнения. В скважине 237 отмечалось увеличенное содержание нитри-

тов, а затем нитратов до 23,4 мг/дм³. На периферии загрязненной зоны скорость нитрификации была выше скорости процессов, приводящих к накоплению аммония. Таблица 4 – Динамика содержания аммония, нитрита и нитрата в грунтовых водах, загрязненных нефтепродуктами

Скважина	Формы азота	Дата отбора проб								
		29.04.2004	10.09.2004	29.04.2005	26.09.2005	09.03.2006	21.04.2006	31.10.2006	29.03.2007	22.09.2007
		Концентрация, мг/дм ³								
237	Аммоний	0,07	н.о.	н.о.	н.о.	5,03	0,55	0,21	0,08	0,15
	Нитрит	н.о.	0,008	н.о.	н.о.	55,43	10,95	н.о.	0,21	н.о.
	Нитрат	1,0	0,518	3,70	н.о.	6,90	23,42	9,71	1,11	2,22
	Суммарное количество азота	1,07	0,526	3,7	46,42	67,36	34,92	9,92	1,4	2,37
159	Аммоний	5,14	2,04	н.о.	0,45	53,42	52,29	40,5	52,29	4,42
	Нитрит	0,019	0,13	н.о.	2,44	0,057	0,02	0,029	0,02	0,05
	Нитрат	0,44	2,52	н.о.	81,10	0,57	0,82	1,54	0,88	0,83
	Суммарное количество азота	5,599	4,69	0	83,99	54,047	53,13	42,069	53,19	5,3
239	Аммоний	1,71	н.о.	2,07	1,13	3,55	3,44	0,28	2,14	2,29
	Нитрит	0,009	н.о.	0,017	0,05	0,035	0,02	0,002	н.о.	0,12
	Нитрат	0,25	н.о.	0,44	0,69	1,03	1,12	2,84	0,61	3,29
	Суммарное количество азота	1,969	0	2,527	1,87	4,615	4,58	3,12	2,75	5,7

В общем виде содержание окисленных и восстановленных форм азота в скважинах с разным уровнем загрязнения показано на рисунке 12. Содержание аммонийного азота намного выше в воде загрязненного участка (159, 239, 589), чем за его пределами (161, 240).

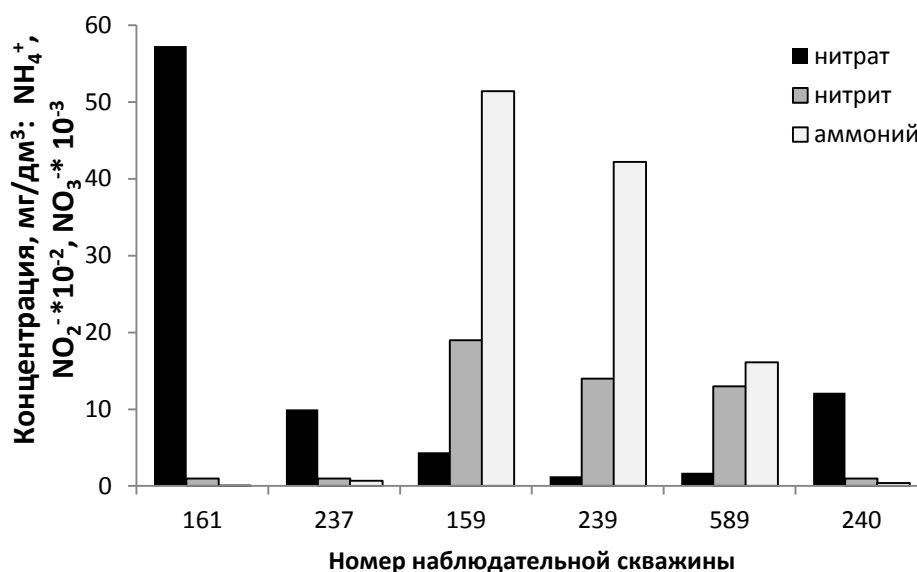


Рисунок 12 – Содержание аммонийной, нитритной и нитратной формы азота в грунтовых водах мазутного хозяйства ТЭЦ после внесения биогенных элементов.

В некоторых скважинах (239, 589) после внесения биогенных элементов отмечался противофазный характер изменения содержания аммония и нитрата (рис. 13).

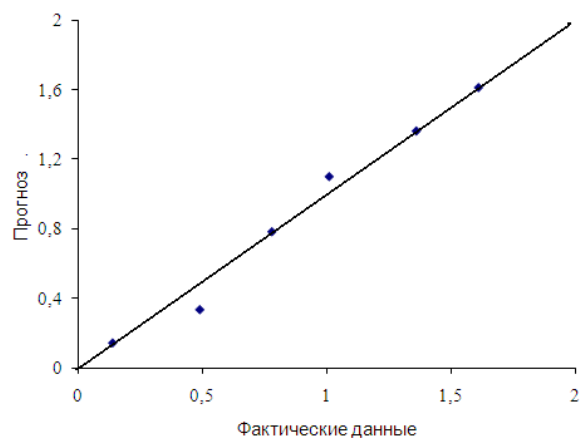
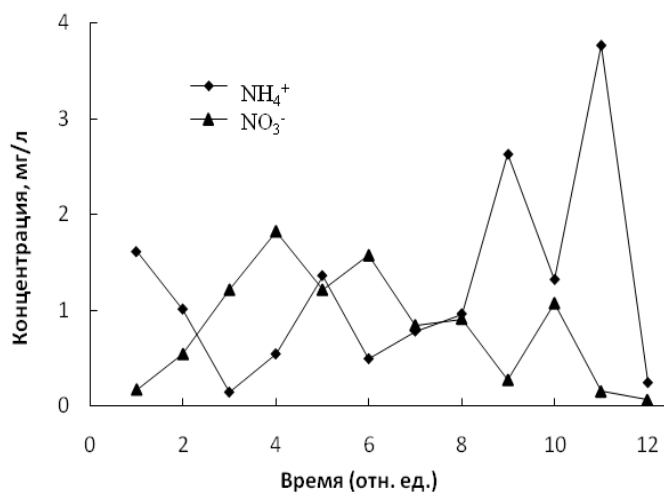


Рисунок 13 – Динамика концентраций аммония и нитрата в грунтовых водах из скважины 589 (период с апреля 2004 по октябрь 2010 гг.).

Рисунок 14 – Результаты обучения нейросети для прогнозирования концентраций аммония/нитрата в грунтовых водах (по данным скважины 589, 2004 – 2007 гг.).

Это дает основание предположить, что в грунтовых водах в районе скважины 589 протекают достаточно интенсивные процессы биодegradации азотсодержащих углеводов и нитрификации. Таким образом, несмотря на то, что в скважину 589 не вносили биогенные элементы, в воде произошла интенсификация процессов биодegradации углеводов. Для подтверждения этого предположения часть данных о составе грунтовых вод была использована для обучения нейронной сети распознаванию динамики концентраций аммонийной и нитратной форм азота, характерной для этих процессов (рис. 14) (Трусей и др., 2017). Высокая обучаемость (на данных за 2004 – 2007 гг.) и соответствие прогнозов нейросети фактическим данным за 2008 – 2010 гг. свидетельствует о высокой активности биодegradации азотсодержащих углеводов и нитрификации, и их определяющей роли для концентрации аммония, нитрита и нитрата в грунтовой воде.

Стоит отметить, что на содержание ионов нитрата в воде помимо нитрификации влияют и анаэробные процессы, а именно денитрификация и диссимиляционная аммонификация (диссимиляционная редукция нитрата до аммония) (Плакунов и Николаев, 2010; Паничева и др., 2012). При этом последний процесс способствует накоплению ионов аммония в воде, однако для его запуска необходим нитрат, которого на начальный момент в грунтовой воде было крайне мало (табл. 6). В общем виде схему микробиологических процессов преобразования химических форм азота, протекающих в грунтовых водах, загрязненных нефтепродуктами, можно представить в виде схемы (рис. 15).

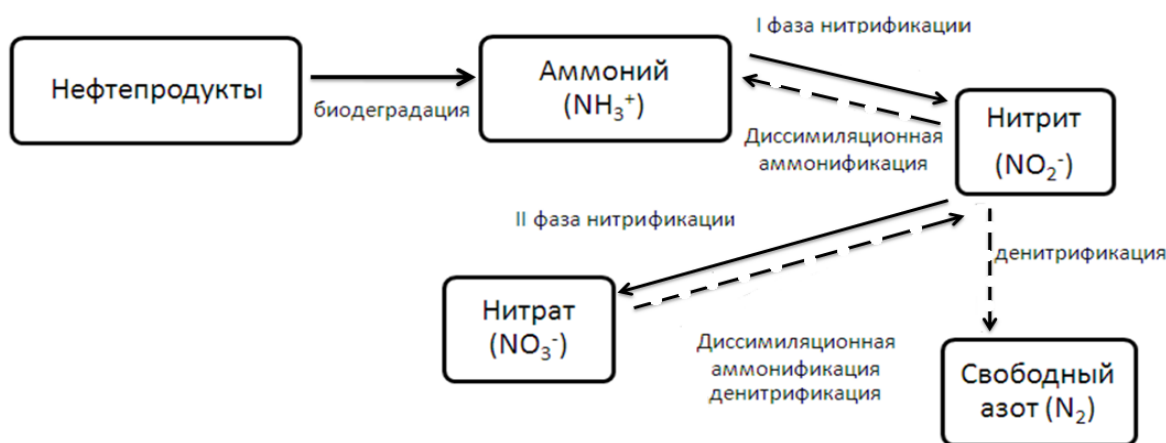


Рисунок 15 – Схема микробиологических процессов преобразования химических форм азота в грунтовых водах загрязненных нефтепродуктами.

В работе также анализировали изменение содержания сульфата в грунтовых водах, свидетельствующее о протекающей сульфатредукции. В отличие от денитрифицирующей численность сульфатредуцирующих бактерий имела практически один порядок величин (10^2 КОЕ/мл) на протяжении всего периода наблюдений. Изменение численности сульфатредуцирующих бактерий (на 2 порядка) при внесении минеральных элементов отмечалось только к скважине 237. Концентрация сульфата до обработки колебалась в пределах $85,4 - 156$ мг/дм³, после – увеличилась до $355,2$ мг/дм³. При этом в ряде скважин (239 и 160) концентрация сульфата не изменилась и периодически снижалась до значений ниже порога обнаружения. В отличие от остальных скважин, данные скважины расположены в грунтах с повышенной плотностью, где скорость фильтрации воды наименьшая. Это способствует формированию восстановительной среды благоприятной для развития сульфатредуцирующих бактерий. Проанализировав динамику концентрации сульфата в скважине 239 обнаружили, что она имеет противофазный характер с концентрацией гидрокарбоната (рис. 16), что свидетельствует о протекающей сульфатредукции. Результаты нейросетевого анализа показали, что процесс сульфатредукции не характерен для всего участка мазутного хозяйства, протекает только в некоторых зонах.

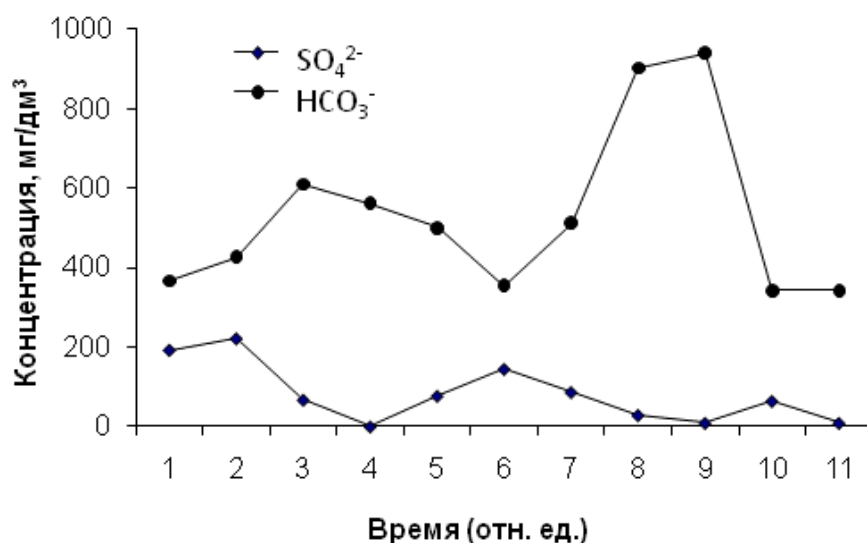


Рисунок 16 – Динамика концентраций сульфата и гидрокарбонат-иона в грунтовых водах 239 скважины в период апреля 2004 по октябрь 2010 гг.

Стимуляция аэробных и анаэробных микроорганизмов посредством внесения биогенов способствовала усилению биodeградации нефтепродуктов. Содержание нефтепродуктов в грунтовых водах на всем проблемном участке снизилось с 500 – 120 мг/дм³ до 10 – 1,5 мг/дм³.

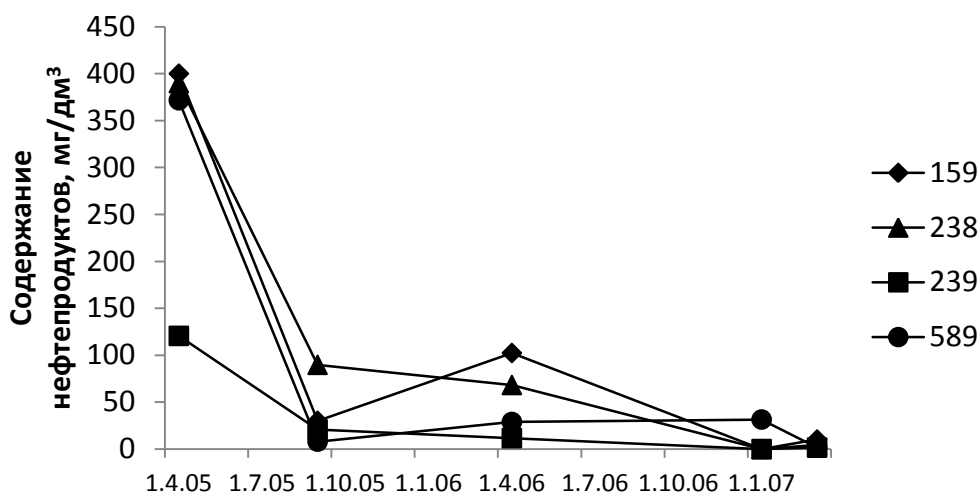


Рисунок 17 – Динамика снижения концентрации нефтепродуктов в грунтовой воде мазутного хозяйства ТЭЦ.

Визуально фиксировалось исчезновение пленки нефтепродуктов на поверхности воды. В настоящий момент только в отдельных скважинах на поверхности грунтовых вод в весенний период наблюдается слой нефтепродуктов мощностью не более 0,07 м, а в остальных – содержание нефтепродуктов соответствует фоновому (Заключение ООО «Минусинская гидрогеологическая партия» Об эффективности методики стимуляции автохтонных микроорганизмов для биоремедиации грунтов, загрязненных нефтепродуктами). В особо загрязненных наблюдательных скважинах (159 и 239), где изначально наблюдалось отсутствие тока грунтовых вод, улучшилась проходимость, фильтрация воды восстановилась. Таким образом, проведенные мероприятия по биостимуляции геологической среды, загрязненной углеводородами, показали свою эффективность.

ВЫВОДЫ

1. В условиях Средней Сибири в сообществе микроорганизмов верхнего горизонта исследуемой нефтезагрязненной почвы 93,7% психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов, учитываемых на используемых питательных средах, относятся к факультативным психрофилам, а 6,3% – облигатным. У исследуемых изолятов бактерий при культивировании на минерально-солевой среде с нефтью температурный оптимум роста смещается более высокую зону, а диапазон роста сужается по отношению к росту на пептонном агаре; показатель силы влияния температуры на рост бактерий на средах составляет 84,7% и 38,2%, соответственно.

2. В поверхностном горизонте исследуемой нефтезагрязненной почвы численность психрофильных микроорганизмов по отношению к мезофильным ниже для соответствующих эколого-трофических групп, как правило, на порядок; она возрастает в 2-5 раз при низких температурах. В грунтах соотношение численностей псих-

рофильных и мезофильных микроорганизмов различается по глубине: в верхних горизонтах преобладают мезофильные, на глубинах 12-15 м – психрофильные.

3. В лабораторных и натуральных экспериментах показано, что коррекция условий среды посредством внесения карбамидоформальдегидного полимера, биогенных элементов питания, увеличивает численность психрофильных и мезофильных микроорганизмов на 2-4 порядка, в натурном эксперименте эффект от обработки сохранялся в течение года.

4. Внесение биогенных элементов питания (азота, фосфора) с учетом особенностей ключевых эколого-трофических групп микроорганизмов и динамики гидрохимических показателей грунтовых вод приводит к увеличению численности исследуемых аэробных групп микроорганизмов в грунтах зоны аэрации на порядок, в грунтовой воде на 1-3 порядка; численность денитрификаторов в грунтовой воде увеличилась на 3-4 порядка. При этом наблюдается увеличение доли психрофильных микроорганизмов.

5. Стимуляция биodeградации нефтепродуктов сопровождается изменением гидрохимического состава грунтовых вод: увеличивается концентрация аммония, нитрата, нитрита, углекислого газа, перманганатная окисляемость воды, которые служат индикаторами восстановления геологической среды. В результате стимуляции содержание нефтепродуктов в грунтовых водах снизилось с 500 – 120 мг/дм³ до 10 – 1,5 мг/дм³.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из перечня ВАК:

1. **Трусей И.В.** Анализ содержания ионов нитрата и аммония при биоремедиации грунтовой воды, загрязненной нефтепродуктами / **И.В. Трусей**, Ю.Л. Гуревич, В.П. Ладыгина, Ю.П. Ланкин, С.В. Фадеев // Химия в интересах устойчивого развития. – 2017. – Т. 25, № 2. – С. 205-211.

2. **Трусей И.В.** Влияние агрохимической обработки нефтезагрязненной почвы на динамику численности мезофильных и психрофильных микроорганизмов / **И.В. Трусей**, Ю.Л. Гуревич, В.П. Ладыгина // Поволжский экологический журнал. – 2016. – № 4. – С. 467-475.

3. **Трусей И.В.** Распределение микроорганизмов в загрязненном нефтепродуктами грунте / **И.В. Трусей**, А.Ю. Озерский, Ю.Л. Гуревич, В.П. Ладыгина // Сибирский экологический журнал. – 2009. – Т. 16, № 1. – С. 29-35. (**Trusei I.V.** Distribution of microorganisms in the oil-polluted ground of vadose and saturation zones/ **I.V. Trusei**, A.Yu. Ozerskii, V.P. Ladygina, Yu.L. Gurevich // Contemporary Problems of Ecology. – 2009. – Т. 2, № 1. – С. 22-26.)

4. Мелкозеров В.М., Очистка нефтезагрязненных земель и водоемов Сибири с применением адсорбентов / В.М. Мелкозеров, С.И. Васильев, А.Я. Вельп, Л.Н. Горбунова, Ю.Л. Гуревич, В.П. Ладыгина, **И.В. Трусей** // Нефтепромысловое дело. – 2010. – № 11. – С. 58-62.

В материалах конференций:

5. **Таушева (Трусей) И.В.** Анализ численности углеводородокисляющих микроорганизмов в загрязненной нефтью почве / **И.В. Таушева (Трусей)**, Н.В. Андрушко

// Тезисы конференции «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий». Абакан, 2002. – С. 38.

6. **Таушева (Трусей) И.В.** Микрофлора почвы и грунта, загрязненных углеводородами нефти/ **И.В. Таушева (Трусей)** // Материалы конференции молодых учёных, Красноярск, 2003. – С. 43-44.

7. **Таушева (Трусей) И.В.** Психрофильная микрофлора загрязненных углеводородами нефти почвы и грунта / И.В. Таушева (Трусей) // Тезисы конференций «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий». Абакан, 2003. – С. 38.

8. **Таушева (Трусей) И.В.** Оценка возможности деструкции углеводородов нефти в загрязненном грунте/ **И.В. Таушева (Трусей)**, Ю.Л. Гуревич, В.П. Ладыгина, А.Ю. Озерский // Материалы конференции «Социальные проблемы инженерной экологии, природопользования и ресурсосбережения». Красноярск, 2003. – С. 194-200.

9. Гуревич Ю.Л. Биоремедиация загрязненных нефтью земель: теория и практика / Ю.Л. Гуревич, В.С. Ковалев, В.П. Ладыгина, **И.В. Таушева (Трусей)** // Тезисы докладов научно-практической конференции «Теоретические и практические вопросы мониторинга, предупреждения, ликвидации и рекультивации последствий нефтяного загрязнения». Тюмень, 2003. – С. 8-10.

10. **Трусей И.В.** Динамика численности углеводородокисляющих микроорганизмов в загрязненной нефтью почве зоны умеренного климата / **И.В. Трусей**, В.П. Ладыгина, Ю.Л. Гуревич // Материалы IV съезда Докучаевского общества почвоведов «Почвы – национальное достояние России», Новосибирск: Наука-Центр, 2004. – С. 688.

11. Белякова С.В. Исследование влияния температуры среды на доступность углеводородного субстрата для мезофильных и психрофильных микроорганизмов нефтезагрязненной почвы / С.В. Белякова, **И.В. Трусей**, Ю.Л. Гуревич // Сборник тезисов 10-ой Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых: Тезисы докладов: Т.1, Екатеринбург – Красноярск: АСФ России, 2004. – С. 793-794.

12. Ladygina V.P. Bioremediation of the fuel oil contaminated subsurface/ V.P. Ladygina, **I.V. Trusey**, Y.L. Gurevich // The 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE 2008), May 16-18, 2008 Shanghai, China. Vol. V: Environmental Pollution and Public Health (2). <http://www.icbbe.org> <http://ieeexplore.ieee.org/servlet/opac?punumber=4534879> (дата обращения: 2.02.2018).

13. **Трусей И.В.** Экологические особенности психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов нефтезагрязненной почвы / **И.В. Трусей**, Ю.Л. Гуревич, С.В. Хижняк // Сборник статей Международной научно-практической конференции: ADVANCED SCIENCE: в 3 частях. – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение», 2017. – С. 32-36.